

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.C1⁶ G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.C1⁶ G01N27/327, G01N27/416

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1999 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE 「tetrazolium」 × 「ENZYME」 × 「ELECTROD?」

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 9-286784, A (Dojindo Laboratories Co., Ltd.), 4 November, 1997 (04. 11. 97) & WO, 9738985, A & AU, 9725758, A	1-5
A	US, 5387515, A (British Technology Group Limited), 7 February, 1995 (07. 02. 95) & GB, 2231332, A & WO, 9013634, A & AU, 5647890, A & HU, 904408, A & EP, 471740, A & US, 5298414, A	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
8 April, 1999 (08. 04. 99)

Date of mailing of the international search report
20 April, 1999 (20. 04. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



(51) 国際特許分類6 G01N 27/327	A1	(11) 国際公開番号 WO00/57166 (43) 国際公開日 2000年9月28日 (28.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/01392 (22) 国際出願日 1999年3月19日 (19.03.99) (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 札幌イムノ・ダイアグノスティック・ ラボラトリー (SAPPORO IMMUNO DIAGNOSTIC LABORATORY)[JP/JP] 〒001-0922 北海道札幌市北区新川二条2丁目12-20 Hokkaido, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 篠塚直樹 (SHINOZUKA, Naoki)[JP/JP] 横山 徹 (YOKOYAMA, Toru)[JP/JP] 中村健治 (NAKAMURA, Kenji)[JP/JP] 〒001-0922 北海道札幌市北区新川二条2丁目12-20 株式会社 札幌イムノ・ダイアグノスティック・ ラボラトリー内 Hokkaido, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, PL, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: METHOD OF DETERMINING SUBSTRATE, AND BIOSENSOR (54) 発明の名称 基質の定量方法およびバイオセンサ <div data-bbox="175 1283 1429 1503" data-label="Diagram"> <pre> graph LR Substrate --> Dehydrogenase Product Coenzyme_Ox["(Oxidized form) Coenzyme"] --> Dehydrogenase Coenzyme_Red["(Reduced form) Coenzyme"] Coenzyme_Red --> Electron Mediator EM_Red["(Reduced form) Electron Mediator"] EM_Red --> Tetrazolium salt Formazan EM_Red --> Electrode EM_Ox["(Oxidized form) Electron Mediator"] EM_Ox --> Electron Mediator Coenzyme_Ox Electrode --> e_minus["e-"] </pre> </div> (57) Abstract A method of determining a substrate, which is contained in various kinds of samples, simply and speedily without requiring a troublesome pretreatment; and a biosensor, the method, in which an electrode system formed by using a conductive material, and a reaction reagent comprising at least a dehydrogenation enzyme, a coenzyme, an electron mediator and tetrazolium salts are used, comprising generating an enzyme reaction and an oxidation reduction reaction by the reaction reagent and a substrate in a sample, and then detecting formazane, a final formed product by using the electrode system; the biosensor utilizing the same method.		

本発明は、種々の試料に含まれる基質を煩雑な前処理を必要としない簡便でしかも迅速な基質の定量方法およびバイオセンサを提供するものである。具体的には、導電性材料を用いて形成された電極系と少なくとも脱水素酵素と補酵素と電子メディエータおよびテトラソリウム塩類からなる反応試薬を用いており、反応試薬と試料中の基質により酵素反応および酸化還元反応を生じさせ、最終生成物であるホルマザンを電極系を用いて検出する基質の定量方法およびそれを利用したバイオセンサを提供するものである。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CC	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	JP	日本	NO	ノールウェー	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
		KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

基質の定量方法およびバイオセンサ

発明の分野

- 5 本発明は、血液、尿、唾液、汗などの生体試料や食品、環境試料などの種々の試料に含まれる基質を煩雑な前処理を必要としない簡便でしかも迅速な基質の定量方法およびバイオセンサに関する。具体的には、導電性材料を用いて形成された電極系と種々の試薬からなる反応を用いた基質の定量方法およびそれを利用したバイオセンサに関する。

10

発明の背景

- 従来より、脱水素酵素および補酵素を用いた基質の定量は、臨床検査、食品分析等の分析化学分野において利用価値が認められている。脱水素酵素および補酵素を触媒として用いる酵素反応は、試料中に含まれる基質を特異的に酸化するとともに、補酵素を還元する反応のことであり、生体内では数百種類もの脱水素酵素反応が確認されている。この酵素反応は、試料中の基質の定量または酵素活性の測定等に応用できることから非常に重要な反応であり、一般に、反応によって生成した還元型補酵素を検出することで測定が行われる。

- この反応から生成した還元型補酵素を定量する方法として、液体クロマトグラフィ (Analytical Biochemistry, Vol.146, p.118 (1985)) および紫外領域の吸光光度法 (Clinical Chemistry, Vol.22, p.151(1976)) 等がある。さらに還元型補酵素と酸化剤、例えばテトラゾリウム塩類 (特開平 9-286784, Analyst, Vol.120, p.113(1995))、フェリシアン化物、キノン類、シトクロム類、金属イオン等を用いて酸化還元反応を行い、生成した還元物質を可視領域の吸光光度法で定量する方法等もある。しかし、これらの方法では、希釈や分離等の前処理を必要とすることから簡便でしかも迅速な測定とは言い難く、さらに大がかりで高価な測定装置を必要とするなどの問題もある。

近年、酵素反応から生成した還元型補酵素を簡便でしかも迅速に定量する方法

として、電気化学的に検出するバイオセンサが用いられてきている。この場合の検出方法として、還元型補酵素を直接電気化学的に検出する方法が考えられる

(Analytica Chimica Acta, Vol.336, p.57 (1996))。しかし、還元型補酵素は、電子伝達による酸化還元反応が困難であることから、電極上での還元型補酵素の直接

5 酸化は高い印加電位を必要とする。この高い印加電位により電極の汚損または共存物質による影響が起こる。この点を改善するため、バイオセンサに関して発表された多くの報告および特許出願公開公報では、電子メディエータを用いることにより問題を解決しようとして取り組んでいる(特開平10-165199)。現在、

10 バイオセンサに用いられる電子メディエータとして、フェナジン類の1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート(1-メトキシ PMS)

(Analyst, Vol.119, p.253(1994))やメルドラブルー(Aalytica Chimica Acta, Vol.329, p.215(1996))、フェリシアン化物(Aalytical Chemistry, Vol.59, p.2111(1987))、フェロセン(Aalytical Chemistry, Vol.70, p.4320(1998))、キノン類(Biosensors & Bioelectronics, Vol.11, p.1267(1996))等がある。これらの電子メディエータは、還

15 元型補酵素との酸化還元反応によって還元され、生成した還元型電子メディエータは電極上で電位印加により容易に酸化還元反応する。そのため、直接還元型補酵素を電極により酸化する場合に比べ、より低い印加電位による検出が可能になる。

本発明発明者らもこれまでに種々の脱水素酵素と補酵素の酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)および電子メディエータの1-メトキシ PMSを反応試薬に用いて、電極系と一体化させたバイオセンサ(特願平10-201553, PCT/JP98/03194)を考案し、種々の基質に対して簡便でしかも迅速な定量が可能なバイオセンサを構築してきた。これらのバイオセンサは、導電性材料を用いて印刷手法によって形成した作用極と対極を対向させた電極間に、反応試薬をすべて担持した吸収性担体を配置したバイオセンサであり、各基質濃度に依存する直線的できわめて良好な応答電流が確認されている。しかし、その後の検討から、これらのバイオセンサは基質の低濃度領域における応答電流が試料中の共存物質の影響を受けやすいという改善の余地が見出

された。その原因として、電子メディエータの標準酸化還元電位が非常に低いために、還元型電子メディエータは容易に試料中の共存物質である酸化還元物質と反応する化学的に不安定な物質であることが考えられた。その結果、基質の低濃度領域における応答電流のばらつきおよび低下が生じていたものと考えられる。

- 5 したがって、応答電流が安定でしかも高精度な定量をするには、さらに改善する必要があった。

発明の要旨

- 10 本発明は上記の課題を解決するために、導電性材料を用いて形成された電極系と、少なくとも脱水素酵素と補酵素と電子メディエータに加えて、さらにテトラゾリウム塩類からなる反応試薬とを用いた、基質の定量方法およびバイオセンサを提供するものである。

- 15 本発明による方法と従来の還元型補酵素の直接酸化あるいは種々の電子メディエータを用いた方法を比較すると、化学的に安定なホルマザンを最終的に生成させているため、変動の少ない応答電流が得られる。また、応答電流の大幅な増大ならびに検出感度の向上が見られることから、さらに低濃度領域での基質の定量が可能となることが挙げられる。これより、試料中の基質の高精度な定量が実現される。

20 発明の説明

- 25 本発明によれば、導電性材料を用いて形成された少なくとも作用極と対極からなる電極系と、少なくとも脱水素酵素と補酵素と電子メディエータおよびテトラゾリウム塩類からなる反応試薬とを用いた基質の定量方法、および電極系と反応試薬を一体化させ、簡便でしかも迅速な定量が可能なバイオセンサを提供するものである。

本発明において、試料中の基質は反応試薬である脱水素酵素および補酵素による特異的な酵素反応によって還元型補酵素を生成する。この還元型補酵素は、すみやかに電子メディエータおよびテトラゾリウム塩類との酸化還元反応が進行

し、化学的に安定なホルマザンを最終的に生成する。続いて電極系に電位を印加することでホルマザンを電気化学的に変化させ、その際に生じる応答電流を検出する。この応答電流が基質濃度に依存することから、基質の定量が可能となる。

上記一連の反応を概略的に図5に示す。また、最終的に反応するテトラゾリウム塩類および最終的に生成されるホルマザンは図6に示すような基本的な構造式を有する。

本発明における測定可能な基質とは、脱水素酵素を触媒として、還元型補酵素を生成する脱水素酵素反応のあらゆる基質が挙げられる。この酵素反応を用いることで、基質の定量をはじめ、酵素活性の測定等の応用も可能となる。このように、非常に広範囲な基質をもちいることができ、さまざまな測定への応用が可能となる。具体的には、アルコール、ガラクトース、グルコース、コレステロール、乳酸、フェニルアラニン、ロイシン等が基質として挙げることができるが、その他、非常に多岐に渡る基質の測定が可能であることは明らかである。

本発明では、化学的に安定なホルマザンを最終的に生成させているため、変動の少ない応答電流が得られる。基質からのホルマザン生成への反応は、すみやかにかつ定量的に生じていることが前述の可視領域の吸光光度法で既に確認されており（特開平9-286784, Analyst, Vol.120, p.113(1995)）、本発明によって、さらに電極系による検出が可能ながことが明らかになり、より有用な定量方法が創出された。その結果、我々がこれまでに構築したバイオセンサの基質1 mMに対する電流密度は、約4~12 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ であり、また従来のバイオセンサ、例えばフェリシアン化物（Analytical Chemistry, Vol.59, p.2111(1987)）、フェロセン（Analytical Chemistry, Vol.70, p.4320(1998)）、キノン類（Biosensors & Bioelectronics, Vol.11, p.1267(1996)）を電子メディエータに用いたバイオセンサの電流密度は、それぞれ、約2 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ （p.2114, Fig.6より算出）、約6 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ （p.4323, Fig.4より算出）、約10 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ （p.1273, Fig10）であるのに対し、本発明のバイオセンサでは約120 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ であることから、応答電流の大幅な増大ならびに検出感度の向上が見られ、さらに低濃度領域における基

質の定量が可能となった。このことから、本発明の基質の定量方法およびバイオセンサを用いることにより、基質の高精度な定量が実現された。

図面の簡単な説明

- 5 図 1 は本発明の一実施例におけるバイオセンサの構成部分の分解図であり；
図 2 は実施例 2 におけるバイオセンサの基本応答を示すグラフであり；
図 3 は実施例 3 における還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）に対する応答の結果を示すグラフであり；
図 4 は実施例 4 における L-フェニルアラニンに対する応答の結果を示すグラ
10 フであり；
図 5 は本発明の反応模式図であり；
図 6 はテトラゾリウム塩類およびホルマザンの基本の構造式である。

上記図中の符号は次のように説明される：

- 15 1 は絶縁性支持体；2 は作用極；3 は対極；4 は絶縁層；5 は吸収性担体である。

好適具体例の説明

本発明に用いられる電極系としては、導電性物質であり、電気化学的に安定であれば特に制限はなく、材料についてはカーボン、金、銀、銀／塩化銀、ニッケル、白金、白金黒およびパラジウム等、ならびにそれらの合金を使用することが
20 できる。その中でも種々の材料を検討した結果、カーボン材料が安価で化学的に安定しており、本発明における電極系の作用極として好ましいことを見出した。

ここでのカーボン材料とは、カーボンを含む材料全般を意味する。利用できるカーボン材料は特に制限されるものではなく、従来のカーボン電極において使用
25 されているものであれば良く、例えばカーボンファイバ、カーボンブラック、カーボンペースト、グラッシーカーボン、グラファイト等を使用することができる。

このようなカーボン材料は常套の方法によって絶縁性の支持体上に電極部分として形成される。通常、カーボン材料を樹脂バインダー等によりペースト状にし

たものをスクリーン印刷し、それを加熱乾燥することにより形成できる。

絶縁性支持体としては、ガラス、ガラスエポキシ、セラミックス、プラスチック等が挙げられるが、電極部分の印刷形成の際や試料の添加の際に侵されない物質であれば特に制限はない。例えばポリエステル、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ポリプロピレン等のプラスチックフィルムが安価であり、さらに導電性インクとの密着性や加工性の良さから、ここではポリエステルフィルムが好ましいことを見出した。

印刷方法としては、スクリーン印刷に限定されることは特になく、その他、グラビア印刷、オフセット印刷、インクジェット印刷等が応用できる。

- 10 本発明の測定可能な基質としては、脱水素酵素を触媒として、還元型補酵素を生成することが可能な基質であれば特に制限はなく、あらゆる基質の定量が可能である。たとえば、アラニン、アルコール、アルデヒド、イソクエン酸、ウリジン-5'-ジホスフォールグコース、ガラクトース、ギ酸、グリセルアルデヒド-3-リン酸、グリセロール、グリセロール-3-リン酸、グルコース、グルコース-6-リン酸、グルタミン酸、コレステロール、サルコシン、ソルビトール、炭酸、乳酸、3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸、フェニルアラニン、フルクトース、6-ホスフォグルコン酸、ホルムアルデヒド、マンニトール、リンゴ酸、ロイシン等が利用できる。

- 20 本発明に用いられる脱水素酵素としては還元型補酵素を生成する酵素であれば特に制限はなく、また由来についても特に限定されることはない。例えばアラニン脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素、ウリジン-5'-ジホスフォールグコース脱水素酵素、ガラクトース脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、グリセロール脱水素酵素、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、グルタミン酸脱水素酵素、コレステロール脱水素酵素、サルコシン脱水素酵素、ソルビトール脱水素酵素、炭酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素、ピルビン酸脱水素酵素、フェニルアラニン脱水素酵素、フルクトース脱水素酵素、6-ホスフォ
- 25

グルコン酸脱水素酵素、ホルムアルデヒド脱水素酵素、マンニトール脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ロイシン脱水素酵素等が利用できる。

電子メディエータとしては、還元型補酵素およびテトラゾリウム塩類とすみやかに酸化還元反応を行う物質であれば特に制限はない。例えばキノン類、ジアホラーゼ、シトクロム類、ピオロゲン類、フェナジン類、フェノキサジン類、フェノチアジン類、フェリシアン化物、フェレドキシン類、フェロセンおよびその誘導体等を用いることができる。その中でもフェナジン類がここでは応答の安定性が見られ、特に1-メトキシ PMSは保存安定性が良いことや還元型補酵素およびテトラゾリウム塩類との反応性も優れることから、本発明における電子メディエータとして好ましいことを見出した。

テトラゾリウム塩類としては、ホルマザンを生成するものであれば特に制限はなく、その中でも2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム、1ナトリウム塩(WST-1)は還元したときに生成されるホルマザンが水溶性で化学的に安定であり、また生成したホルマザンが電極系において特異的な応答を示すことから、本発明におけるテトラゾリウム塩類として好ましいことを見出した。

実施例

以下に、本発明の一実施例について具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1 バイオセンサの作製

図1は、バイオセンサの一実施例を示したもので、構成部分の分解図である。

ポリエステルフィルム(ダイアホイルヘキスト(株)製)の絶縁性支持体1に導電性グラファイトインク(日本アチソン(株)製)を用いて作用極2を、導電性銀/塩化銀インク(日本アチソン(株)製)を用いて対極3をスクリーン印刷し、加熱乾燥(60℃, 1時間)した。次に両極の一部分に絶縁性塗料(日本アチソン(株)製)を用いて絶縁層4を形成し加熱乾燥(60℃, 1時間)するこ

とにより電極系を印刷形成した。

酵素反応の至適pHを調整するための緩衝成分は、作用極2上に吸着、乾燥（40℃，15分間）させ固定化した。

- 電子メディエータである1-メトキシ PMS（（株）同仁化学研究所製）は、
5 対極3上に吸着、乾燥（40℃，15分間）させ固定化した。

テトラゾリウム塩類であるWST-1（（株）同仁化学研究所製）と脱水素酵素および補酵素は、リン酸緩衝溶液（pH8.0，20mM）に溶解させたのち、セルロース繊維（アドバンテック東洋（株）製）からなる吸収性担体5に吸着、乾燥（40℃，15分間）させ固定化した。

- 10 緩衝成分を固定化した作用極2と1-メトキシ PMSを固定化した対極3を対向させ、その電極系の電極間にWST-1と脱水素酵素および補酵素を含有させた吸収性担体5を配置してバイオセンサとした。

実施例2 バイオセンサの基本応答の測定

- 15 実施例1で作製したバイオセンサの基本応答を測定した結果を図2に示す。

ここでは、前記バイオセンサにNADHを含む標準溶液と含まない標準溶液をそれぞれ5μL添加した。すなわち、添加したNADHと1-メトキシ PMSおよびWST-1の酸化還元反応によりホルマザンが生成される。本結果はホルマザンのサイクリックボルタモグラムを示す（掃印速度：50mV/秒）（北
20 斗電工（株）製 HZ-3000）。実線がNADH（1.5mM）を含む標準溶液を用いたときの結果であり、破線がNADHを含まない標準溶液を用いたときの結果である。

本結果から、約+500mVに酸化ピークが現れ、ホルマザンの特異的な応答電流が得られた。

25

実施例3 NADHの定量

試料と脱水素酵素および補酵素を反応させた際に生成される還元型補酵素であるNADHを実施例1で作製したバイオセンサを用いて測定を行った結果を図3

に示す。

NADHを含む試料を5 μ L添加し、60秒後に対極を基準に、ここでは+700mVの電位を印加して(北斗電工(株)製 HZ-3000)、その時の応答電流値を測定した(北斗電工(株)製 HZ-3000)。

- 5 本結果から、NADHが0~1.5mMの濃度領域で直線的なきわめて良好な応答が得られた。

このように還元型補酵素を生成するあらゆる脱水素酵素および補酵素を用いた酵素反応への応用が期待できる。

10

実施例4 L-フェニルアラニンの定量

実施例3を参考に、L-フェニルアラニンを含む標準溶液を試料として、実施例1で作製したバイオセンサを用いて測定を行った結果を図4に示す。

- 15 ここでは脱水素酵素としてL-フェニルアラニン脱水素酵素(EC 1.4.1.20)(ユニチカ(株)製)を用いて作製したバイオセンサに、L-フェニルアラニンを含む標準溶液を5 μ L添加し、60秒後に対極を基準に+700mVの電位を印加して、応答電流値を測定した。

また、比較のため従来のバイオセンサを用いて測定を行った結果も図4に示す。

- 20 なお、従来のバイオセンサでは、L-フェニルアラニンを含む標準溶液を5 μ L添加し、60秒後に対極を基準に-220mVの電位を印加して、応答電流値を測定したものである。

- 25 反応試薬に試料を添加すると、試料中の基質は反応試薬である脱水素酵素および補酵素による特異的な酵素反応によって還元型補酵素を生成する。この還元型補酵素は、すみやかに電子メディエータおよびテトラゾリウム塩類との酸化還元反応が進行し、化学的に安定なホルマザンを最終的に生成する。続いて電極系に電位を印加することでホルマザンを電気化学的に変化させ、その際に生じる応答電流を検出する。この応答電流が基質の濃度に依存することから、基質の定量が可能となる。以上、本発明の反応模式図を図5に示す。また、テトラゾリウム

塩類およびホルマザンの基本の構造式を図 6 に示す。

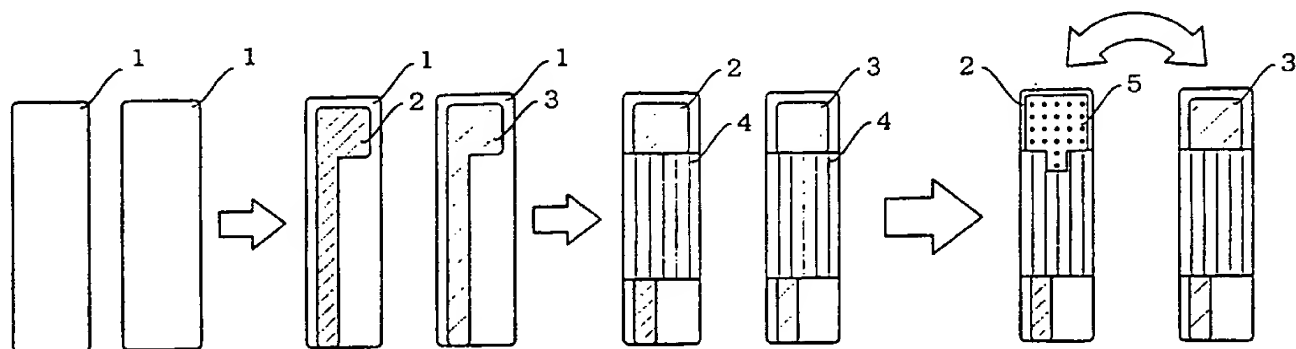
本結果から、L-フェニルアラニンが 0 ～ 1 mM の濃度領域で直線的なきわめて良好な応答が得られた。また、L-フェニルアラニン 1 mM に対する電流密度は約 $120 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ と非常に大きな応答電流が得られた。

5

なお、上記実施例では作用極と対極のみの 2 電極系を含むバイオセンサを使用した。参照極を加えた 3 電極系を用いれば、より正確な定量が可能となる。

請求の範囲

1. 少なくとも脱水素酵素と補酵素と電子メディエータおよびテトラゾリウム塩類からなる反応試薬と試料とにより酵素反応および酸化還元反応を生じさせ、反応の最終生成物であるホルマザンを導電性材料を用いて形成された電極系を用いて検出することを特徴とする前記試料中の基質の定量方法。
2. 基質がアラニン、アルコール、アルデヒド、イソクエン酸、ウリジン-5'-ジホスフォール、グルコース、ガラクトース、ギ酸、グリセリルアルデヒド-3-リン酸、グリセロール、グリセロール-3-リン酸、グルコース、グルコース-6-リン酸、グルタミン酸、コレステロール、サルコシン、ソルビトール、炭酸、乳酸、3-ヒドロキシ酪酸、ピルビン酸、フェニルアラニン、フルクトース、6-ホスフォグルコン酸、ホルムアルデヒド、マンニトール、リンゴ酸またはロイシンであることを特徴とする請求項1記載の方法。
3. 前記電極系にある一定の電位を印加することで前記ホルマザンを電気化学的に変化させ、その際に生じる応答電流を検出することを特徴とする請求項1記載の方法。
4. 前記反応試薬と導電性材料を用いて形成された少なくとも作用極と対極からなる電極系を一体化させ、請求項1記載の方法を用いて前記ホルマザンを検出するためのバイオセンサ。
5. 前記電極系にある一定の電位を印加することで前記ホルマザンを電気化学的に変化させ、その際に生じる応答電流を検出することを特徴とする請求項4記載のバイオセンサ。



- 1 : 絶縁性支持体
 2 : 作用極
 3 : 対極
 4 : 絶縁層
 5 : 吸収性担体

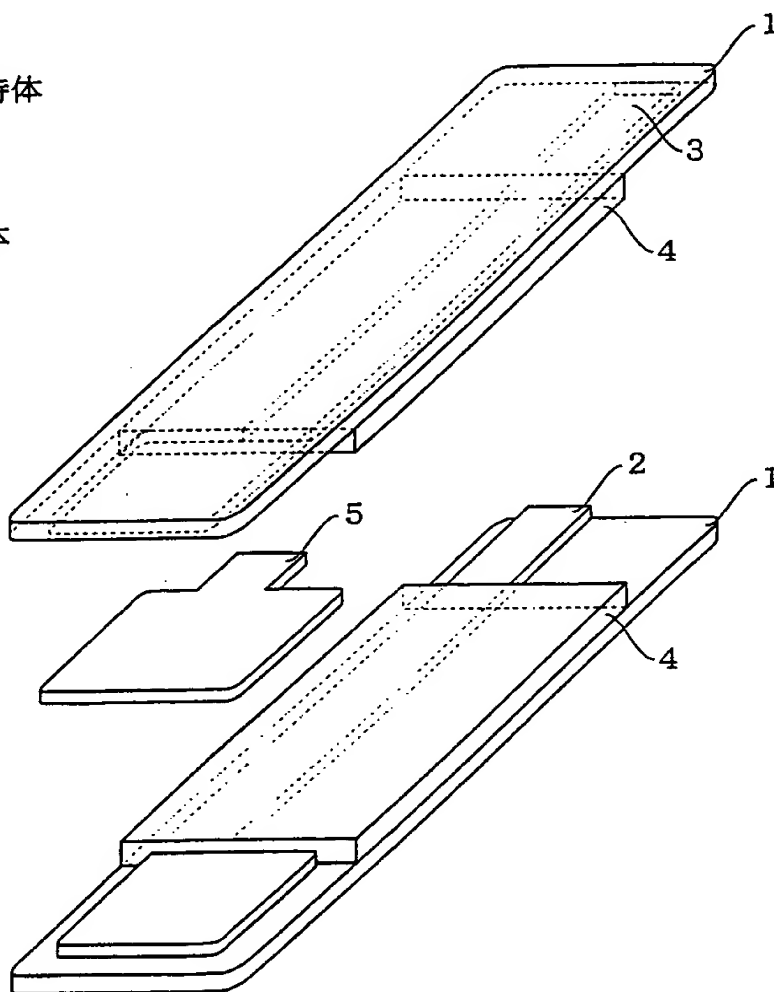


図 1

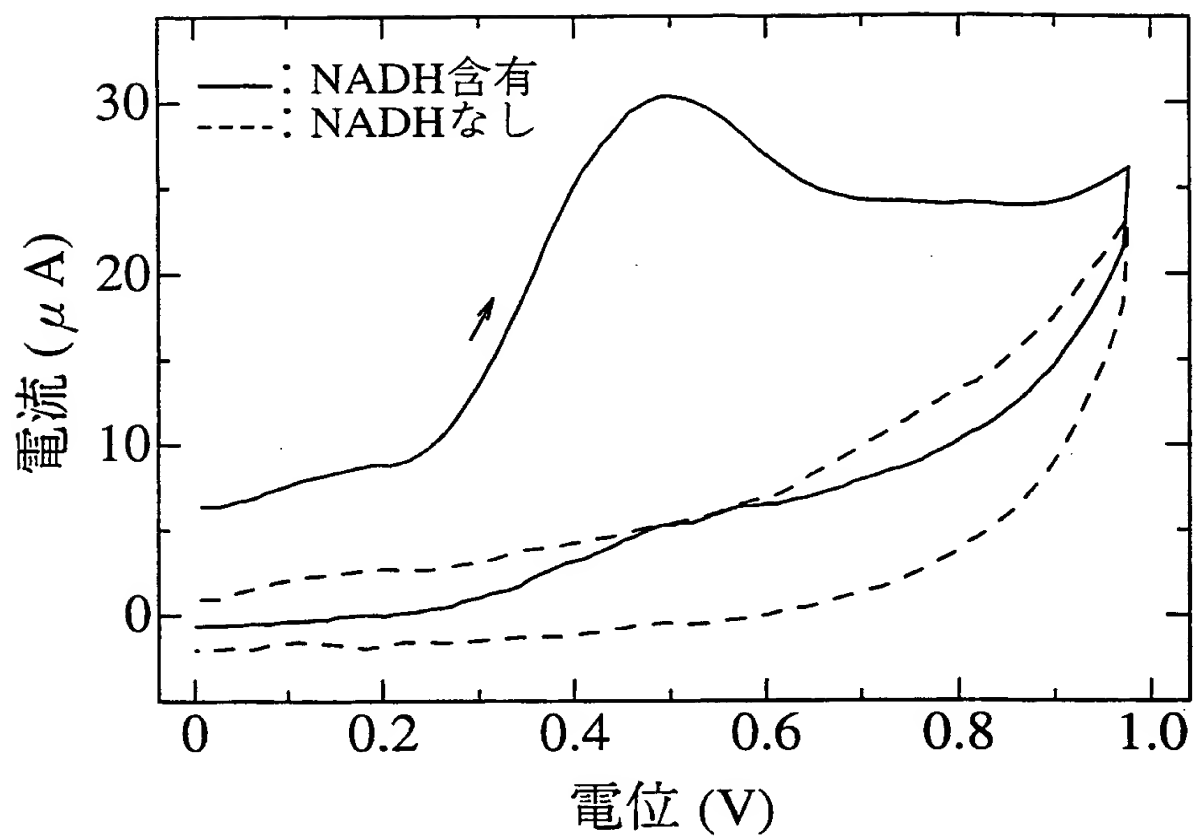


図 2

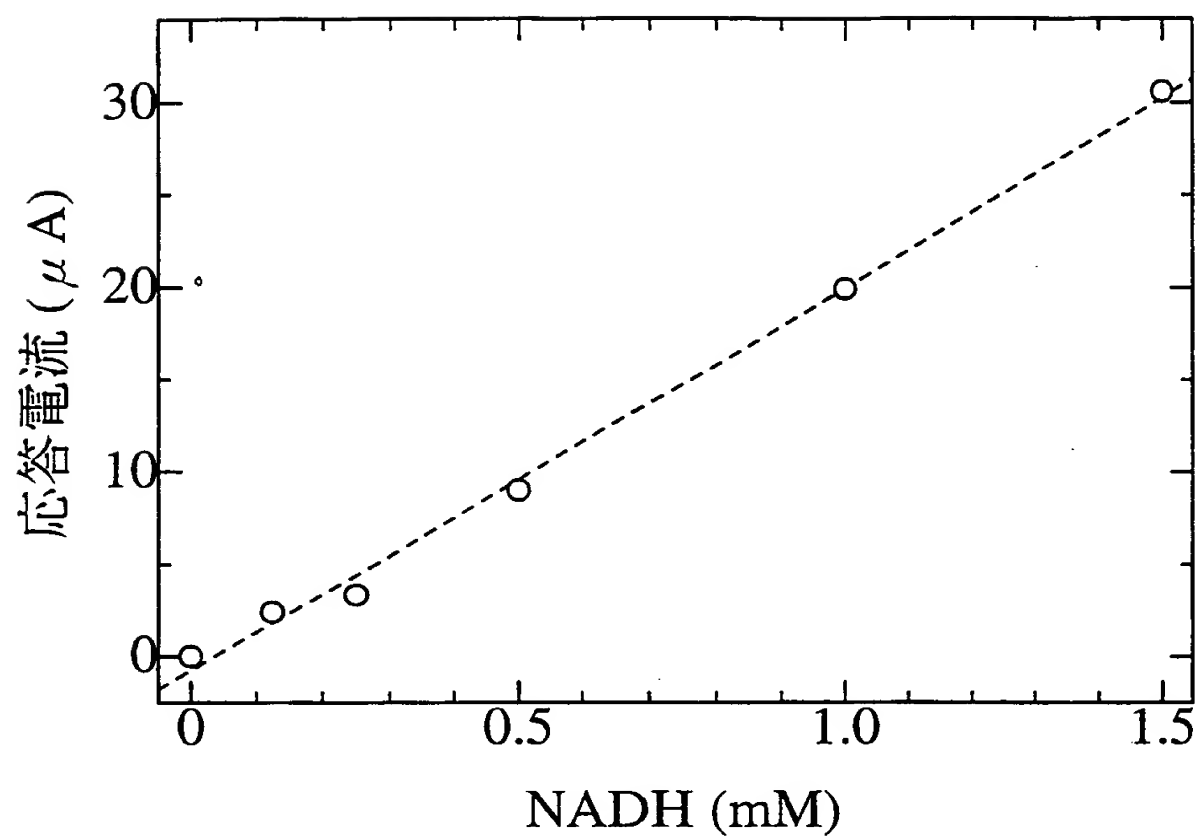


図 3

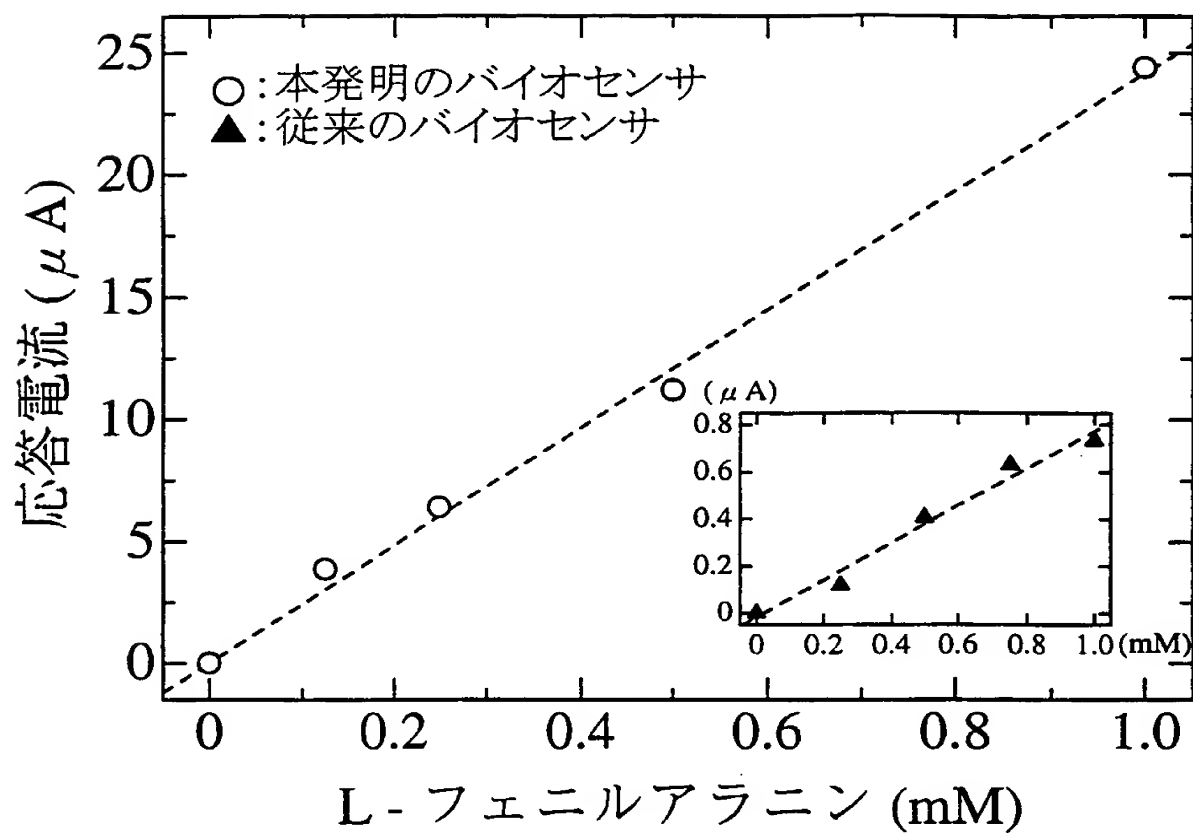


図 4

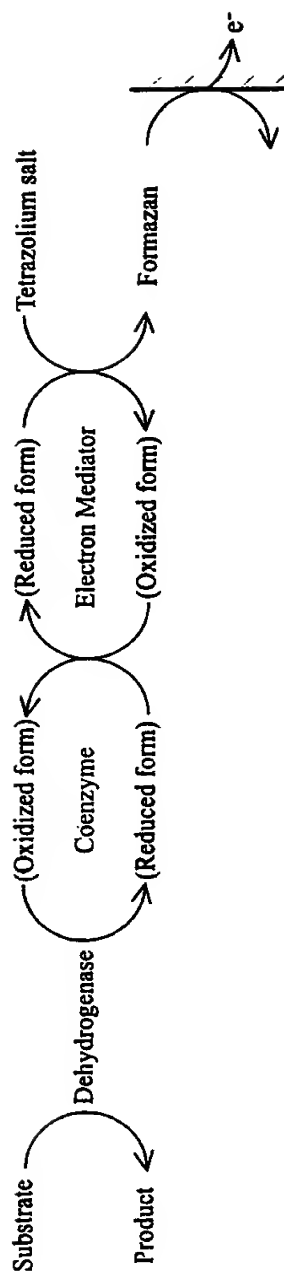


4

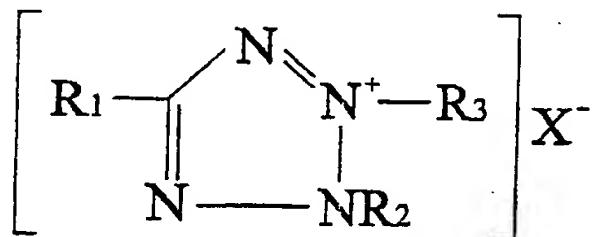
15

1

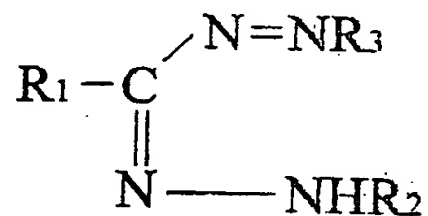
1



5



Tetrazolium salt



Formazan

$\text{R}_1, \text{R}_2, \text{R}_3$: alkyl group
 X^- : halogen

図 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/01392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ G01N27/327

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ G01N27/327, G01N27/416

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1999 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE 「tetrazolium」 × 「ENZYME」 × 「ELECTROD?」

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 9-286784, A (Dojindo Laboratories Co., Ltd.), 4 November, 1997 (04. 11. 97) & WO, 9738985, A & AU, 9725758, A	1-5
A	US, 5387515, A (British Technology Group Limited), 7 February, 1995 (07. 02. 95) & GB, 2231332, A & WO, 9013634, A & AU, 5647890, A & HU, 904408, A & EP, 471740, A & US, 5298414, A	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
8 April, 1999 (08. 04. 99)Date of mailing of the international search report
20 April, 1999 (20. 04. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/01392

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ G 01 N 27/327

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ G 01 N 27/327Int. Cl⁸ G 01 N 27/416

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1999年

日本国公開実用新案公報 1971-1999年

日本国登録実用新案公報 1994-1999年

日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE 「tetrazolium」 × 「ENZYME」 × 「ELECTROD?」

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 9-286784, A (株式会社同仁化学研究所), 4. 11月. 1997 (04. 11. 97), &, WO, 9738985, A, &, AU, 9725758, A	1-5
A	US, 5387515, A (British Technology Group Limited), 7. 2月. 1995 (07. 02. 95), &, GB, 2231332, A, &, WO, 9013634, A, &, AU, 5647890, A, &, HU, 904408, A, &, EP, 471740, A, &, US, 5298414, A	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 04. 99

国際調査報告の発送日

20.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩

2 J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 6633

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

28 September 2000 (28.09.00)

International application No.:

PCT/JP99/01392

Applicant's or agent's file reference:

YCT-408

International filing date:

19 March 1999 (19.03.99)

Priority date:

Applicant:

SHINOZUKA, Naoki et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

12 July 2000 (12.07.00)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

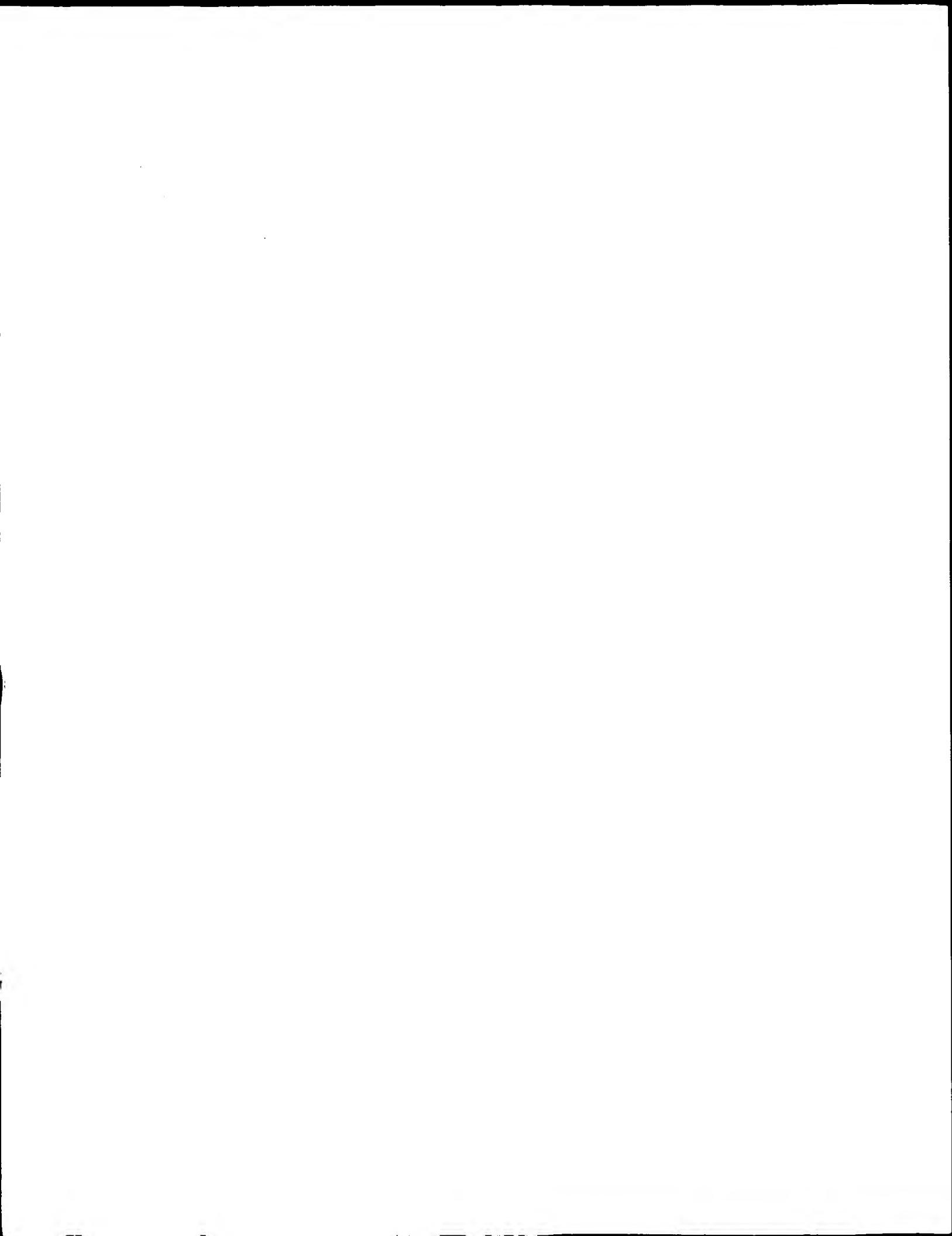
The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38



PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

19.3.99

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum)

YCT-408

Box No. I TITLE OF INVENTION

METHOD OF QUANTIFYING SUBSTRATE AND BIOSENSOR

Box No. II APPLICANT

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory
12-20, Shinkawa Nijo 2-chome, Kita-ku,
Sapporo-shi, Hokkaido 001-0922 Japan

☐ This person is also inventor.

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☒ all designated States except
the United States of America

☐ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

SHINOZUKA Naoki
c/o Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory
12-20, Shinkawa Nijo 2-chome, Kita-ku,
Sapporo-shi, Hokkaido 001-0922 Japan

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box
is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant
for the purposes of:

☐ all designated
States

☐ all designated States except
the United States of America

☒ the United States
of America only

☐ the States indicated in
the Supplemental Box

☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf
of the applicant(s) before the competent International Authorities as:

☒ agent

☐ common representative

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

SHAMOTO, Ichio, (8970) Patent Attorney
YUASA AND HARA, Section 206, New Ohtemachi
Bldg., 2-1, Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-0004 Japan

Telephone No.

(03) 3270-6641

Facsimile No.

(03) 3246-0233

Teleprinter No.

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

YOKOYAMA Toru

c/o Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory
12-20, Shinkawa Nijo 2-chome, Kita-ku,
Sapporo-shi, Hokkaido 001-0922 Japan

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

NAKAMURA Kenji

c/o Sapporo Immuno Diagnostic Laboratory
12-20, Shinkawa Nijo 2-chome, Kita-ku,
Sapporo-shi, Hokkaido 001-0922 Japan

This person is:

☐ applicant only

☒ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

Japan

State (that is, country) of residence:

Japan

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☒ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

This person is:

☐ applicant only

☐ applicant and inventor

☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

This person is applicant for the purposes of:

☐ all designated States

☐ all designated States except the United States of America

☐ the United States of America only

☐ the States indicated in the Supplemental Box

☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.

Box No.V DESIGNATION OF STATES

The following designations are hereby made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☐ **AP ARIPO Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☐ **EA Eurasian Patent:** AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP European Patent:** AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, ~~CY Cyprus~~, DE Germany, ~~DK Denmark~~, ES Spain, ~~FI Finland~~, FR France, GB United Kingdom, ~~GR Greece~~, ~~IE Ireland~~, IT Italy, ~~LU Luxembourg~~, ~~MC Monaco~~, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☐ **OA OAPI Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | | |
|--|--|--|
| <input type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input type="checkbox"/> LR Liberia | |
| <input type="checkbox"/> AL Albania | <input type="checkbox"/> LS Lesotho | |
| <input type="checkbox"/> AM Armenia | <input type="checkbox"/> LT Lithuania | |
| <input type="checkbox"/> AT Austria | <input type="checkbox"/> LU Luxembourg | |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input type="checkbox"/> LV Latvia | |
| <input type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MD Republic of Moldova | |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MG Madagascar | |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia | |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgaria | | |
| <input type="checkbox"/> BR Brazil | <input type="checkbox"/> MN Mongolia | |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MW Malawi | |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input type="checkbox"/> MX Mexico | |
| <input type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NO Norway | |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> NZ New Zealand | |
| <input type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland | |
| <input type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input type="checkbox"/> PT Portugal | |
| <input type="checkbox"/> DE Germany | <input type="checkbox"/> RO Romania | |
| <input type="checkbox"/> DK Denmark | <input type="checkbox"/> RU Russian Federation | |
| <input type="checkbox"/> EE Estonia | <input type="checkbox"/> SD Sudan | |
| <input type="checkbox"/> ES Spain | <input type="checkbox"/> SE Sweden | |
| <input type="checkbox"/> FI Finland | <input type="checkbox"/> SG Singapore | |
| <input type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input type="checkbox"/> SI Slovenia | |
| <input type="checkbox"/> GD Grenada | <input type="checkbox"/> SK Slovakia | |
| <input type="checkbox"/> GE Georgia | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone | |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tajikistan | |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan | |
| <input type="checkbox"/> HR Croatia | <input type="checkbox"/> TR Turkey | |
| <input type="checkbox"/> HU Hungary | <input type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago | |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesia | <input type="checkbox"/> UA Ukraine | |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input type="checkbox"/> UG Uganda | |
| <input type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America | |
| <input type="checkbox"/> IS Iceland | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Uzbekistan | |
| <input type="checkbox"/> KE Kenya | <input type="checkbox"/> VN Viet Nam | |
| <input type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input type="checkbox"/> YU Yugoslavia | |
| <input type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input type="checkbox"/> ZA South Africa | |
| | <input type="checkbox"/> ZW Zimbabwe | |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | <input type="checkbox"/> | |

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

See Notes to the request form

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request.*

1. If, in any of the Boxes, the space is insufficient to furnish all the information: in such case, write "Continuation of Box No. ..." (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular:

- (i) if more than two persons are involved as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available: in such case, write "Continuation of Box No. III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No. III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below;
- (ii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant;
- (iii) if, in Box No. II or in any of the sub-boxes of Box No. III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America: in such case, write "Continuation of Box No. II" or "Continuation of Box No. III" or "Continuation of Boxes No. II and No. III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor;
- (iv) if, in addition to the agent(s) indicated in Box No. II, there are further agents: in such case, write "Continuation of Box No. II" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No. II;
- (v) if, in Box No. I, the name of any State (or OAPI) is accompanied by the indication "patent of addition," or "certificate of addition," or if, in Box No. I, the name of the United States of America is accompanied by an indication "continuation" or "continuation-in-part": in such case, write "Continuation of Box No. I" and the name of each State involved (or OAPI), and after the name of each such State (or OAPI), the number of the parent title or parent application and the date of grant of the parent title or filing of the parent application;
- (vi) if, in Box No. II, there are more than three earlier applications whose priority is claimed: in such case, write "Continuation of Box No. II" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No. II;
- (vii) if, in Box No. II, the earlier application is an ARIPO application: in such case, write "Continuation of Box No. II", specify the number of the item corresponding to that earlier application and indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed.

2. If, with regard to the precautionary designation statement contained in Box No. I, the applicant wishes to exclude any State(s) from the scope of that statement: in such case, write "Designation(s) excluded from precautionary designation statement" and indicate the name or two-letter code of each State so excluded.

3. If the applicant claims, in respect of any designated Office, the benefits of provisions of the national law concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty: in such case, write "Statement concerning non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty" and furnish that statement below.

"Continuation of Box No. IV"

The same address as Box IV

IMAI, Shosuke, (7112) Patent Attorney

MASUI, Chuji, (7669) Patent Attorney

KURITA, Tadahiko, (7523) Patent Attorney

KOBAYASHI, Yasushi, (7527) Patent Attorney

Box No. VI PRIORITY CLAIM		<input type="checkbox"/> Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.		
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country	regional application: * regional Office	international application: receiving Office
item (1)				
item (2)				
item (3)				
<input type="checkbox"/> The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of the present international application is the receiving Office) identified above as item(s):				
* Where the earlier application is an ARIPO application, it is mandatory to indicate in the Supplemental Box at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)). See Supplemental Box.				
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used):		Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)		
ISA / JP				
Box No. VIII CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING				
This international application contains the following number of sheets: request : 5 description (excluding sequence listing part) : 10 claims : 1 abstract : 1 drawings : 6 sequence listing part of description : Total number of sheets : 23		This international application is accompanied by the item(s) marked below: 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature 5. <input type="checkbox"/> priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): 6. <input type="checkbox"/> translation of international application into (language): 7. <input type="checkbox"/> separate indications concerning deposited microorganism or other biological material 8. <input type="checkbox"/> nucleotide and/or amino acid sequence listing in computer readable form 9. <input type="checkbox"/> other (specify):		
Figure of the drawings which should accompany the abstract:		Language of filing of the international application: Japanese		
Box No. IX SIGNATURE OF APPLICANT OR AGENT				
Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request).				
SHAMOTO, Ichio, (8970) Patent Attorney (seal) IMAI, Shosuke, (7112) Patent Attorney (seal) MASUI, Chuji, (7669) Patent Attorney (seal) KURITA, Tadahiko, (7523) Patent Attorney (seal) KOBAYASHI, Yasushi, (7527) Patent Attorney (seal)				

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application: 3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application: 4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2): 5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA / JP	2. Drawings: <input type="checkbox"/> received: <input type="checkbox"/> not received: 6. <input type="checkbox"/> Transmittal of search copy delayed until search fee is paid.

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

6T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-408	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/01392	International filing date (day/month/year) 19 March 1999 (19.03.99)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC G01N 27/327, C12Q 1/00		
Applicant SAPPORO IMMUNO DIAGNOSTIC LABORATORY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 12 July 2000 (12.07.00)	Date of completion of this report 07 August 2000 (07.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01392

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/01392

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability: citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1 (JP, 9-286784, A) cited in the international search report describes a method for improving the stability of aqueous solutions of tetrazolium compounds used in the biosynthesis of water-soluble formazan in a method for measuring light absorption of formazan synthesized by a reaction of a substrate with dehydrogenase.

Document 2 (US, 5387515, A) cited in the international search report states that using phenazine methosulfate as a mediator, nitroblue tetrazolium can be reduced to a formazan, giving a blue-purple color (column 7, lines 41-59).

Claim 1

Neither document 1 nor document 2 describes the detection of formazan using an electrode system. The invention set forth in Claim 1 provides an advantage that could not have been predicted by persons skilled in the art, i.e., "Because chemically stable formazan is ultimately synthesized, a response current with little fluctuation is obtained. Moreover, increases in the amplitude and sensitivity of the response current are seen" (Specification, page 3, lines 13-18).

Claims 2-5

The inventions set forth in Claims 2-5 are subordinate concepts to the invention set forth in Claim 1. As stated above, provided the invention set forth in Claim 1 involves an inventive step, the inventions set forth in Claims 2-5, which are even more restricted, naturally involve an inventive step as well.



PCT

EP



国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-408	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/01392	国際出願日 (日.月.年) 19.03.99	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) 株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 5 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ G01N27/327

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ G01N27/327
Int. Cl⁶ G01N27/416

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1999年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CAS ONLINE 「tetrazolium」 × 「ENZYME」 × 「ELECTROD?」

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 9-286784, A(株式会社同仁化学研究所), 4. 11月. 1997 (04. 11. 97), &, WO, 9738985, A, &, AU, 9725758, A	1-5
A	US, 5387515, A(British Technology Group Limited), 7. 2月. 1995 (07. 02. 95), &, GB, 2231332, A, &, WO, 9013634, A, &, AU, 5647890, A, &, HU, 904408, A, &, EP, 471740, A, &, US, 5298414, A	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 04. 99

国際調査報告の発送日

20.04.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

宮澤 浩



2J

9407

電話番号 03-3581-1101 内線 6633

